

Artykuły przeglądowe

Metody diagnostyki laboratoryjnej stosowane w mikologii

The diagnostic methods applied in mycology

Alicja Kurnatowska¹, Piotr Kurnatowski^{1,2}

¹Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Plac Gen. J. Hallera 1, 90-647 Łódź

²Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Żołnierska 14 c, 10-561 Olsztyn

Adres do korespondencji: Piotr Kurnatowski, Zamorska 46, 93-478 Łódź; E-mail: pkurnatowski@wp.pl

ABSTRACT. The systemic fungal invasions are recognized with increasing frequency and constitute a primary cause of morbidity and mortality, especially in immunocompromised patients. Early diagnosis improves prognosis, but remains a problem because there is lack of sensitive tests to aid in the diagnosis of systemic mycoses on the one hand, and on the other the patients only present unspecific signs and symptoms, thus delaying early diagnosis.

The diagnosis depends upon a combination of clinical observation and laboratory investigation. The successful laboratory diagnosis of fungal infection depends in major part on the collection of appropriate clinical specimens for investigations and on the selection of appropriate microbiological test procedures. So these problems (collection of specimens, direct techniques, staining methods, cultures on different media and non-culture-based methods) are presented in article.

Key words: fungi, collection of specimens, direct techniques, staining methods, cultures

Notowany na całym Świecie wzrost częstości grzybic, zwłaszcza narządowych i uogólnionych oraz związane z nimi powikłania sprawiają, że wykrywanie i rozpoznawanie tych chorób stało się przedmiotem dużego zainteresowania. Niezwykle ważne okazało się wczesne rozpoznanie, poprawiające rokowanie. Niestety, w wielu przypadkach bywa postawione zbyt późno, często w badaniach autopsyjnych, gdyż śmiertelność w grzybicach jest znacznie wyższa niż w zakażeniach wirusowych lub bakteryjnych [1]. Zwiększająca się prevalencja grzybic, wiąże się m.in. z częstym stosowaniem szerokowidmowych antybiotyków przeciwbakteryjnych oraz wzrostem liczby pacjentów w stanie immunosupresji [2, 3].

W diagnostyce zarażeń grzybami uwzględniamy obraz kliniczny (objawy podmiotowe i przedmiotowe) oraz wyniki badań laboratoryjnych, które w znacznym stopniu zależą od prawidłowego po-

brania materiału i wyboru właściwych testów diagnostycznych. Ważne są również informacje dotyczące chorób współistniejących i przebytych, odbytych podróżach, kontaktach ze zwierzętami i zawdzie pacjenta.

Wczesne postawienie diagnozy zwiększa szanse na przeżycie pacjenta, a także chroni go przed długotrwałym przyjmowaniem drogich i toksycznych leków przeciwgrzybiczych.

Należy podkreślić, że objawy podmiotowe i przedmiotowe w grzybicach narządowych często są niespecyficzne, hodowle negatywne, zaś badanie histopatologiczne wymaga inwazyjnych procedur, dla uzyskania materiału do badań [1, 4].

W wypróbowanym przez nas systemie diagnostycznym opracowaliśmy schemat postępowania obejmujące kolejne fazy (F1–F6) rozpoznawania grzybic narządowych.

F1 – analiza kliniczna oraz wyników badań labo-

ratoryjnych: morfologicznych, biochemicznych, serologicznych i innych.

F2 – pobieranie do oceny mikologicznej różnych materiałów biologicznych pacjentów: krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyny z jamy opłucnej, otrzewnej i stawów; materiał z torbieli, ropni, nakłucia zatok przynosowych; próbki z dolnych dróg oddechowych – plwocina; próbki uzyskiwane podczas zabiegów operacyjnych, endoskopii lub biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej; wymazy z jamy ustnej, gardła, jamy nosa, krtani; treść z narządów płciowych, z cewki moczowej, mocz i inne. Warto dodać, że każdy z tych materiałów powinien być pobierany do jałowych pojemników, za pomocą jałowych narzędzi/wacików lub umieszczany bezpośrednio na szkiełkach podstawowych, w płynach utrwalających, przed rozpoczęciem leczenia, albo po jego zakończeniu, z uwzględnieniem czasu wydalania leku, w przypadku preparatów działających ogólnie. Najbardziej optymalne jest pobieranie materiału i wykonywanie preparatów bezpośrednich oraz posiewów przez diagnostę zaraz po ich uzyskaniu.

Wyizolowanie grzybów z krwi zależy od wielu czynników, m.in. ilości pobranej krwi (optimum: 20–30 ml), liczby próbek (większa liczba zwiększa szansę wyizolowania grzybów) oraz zastosowanych metod. W przypadkach ujemnych wyników posie-

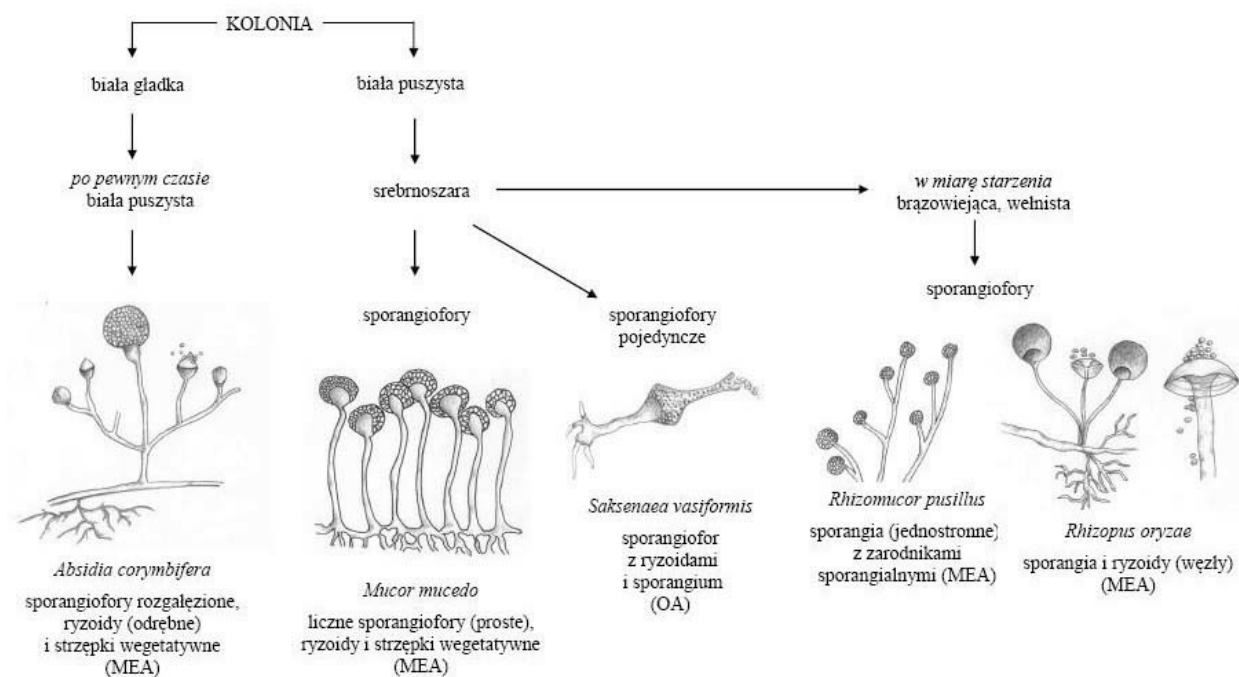
wów krwi żyłnej trzeba pobierać krew tętniczą w dwu próbach, w odstępach 24 h. Obecnie często wykorzystuje się systemy automatyczne, takie jak Bactec System i BacT/Alert System.

Płyn mózgowo-rdzeniowy – w ilości 3–5 ml odwirowywuje się i nadsącz służy do badań serologicznych, zaś osad może być wykorzystany do badania mikroskopowego i wykonania hodowli. Płyny z jamy opłucnej, otrzewnej i stawów po aspiracji lub drenażu zbierane są do sterylnych pojemników, zawierających niewielką ilość heparyny (rozcieńczenie 1:1000). Próbkę odwirowuje się i osad wykorzystuje się do założenia hodowli.

Płyn od pacjentów z dializą otrzewnej powinien być zebrany do pojemnika bez heparyny. Mocz – oddany do sterylnego pojemnika, po przerwie nocnej (strumień środkowy), po wcześniejszym umyciu okolicy ujścia cewki moczowej bieżącą wodą z mydłem.

Materiał z torbieli, ropni, nakłucia zatok przynosowych pobrany za pomocą igły przenosi się do jałowego pojemnika.

Próbki z dolnych dróg oddechowych – plwocina, powinny być pobrane rano, na czczo, po usunięciu dzień wcześniej ew. uzupełnień protetycznych, po zabiegach higienicznych jamy ustnej, uwzględniających też płukanie jamy ustnej przegotowaną wodą,



Rys. 1. Przykłady wstępnego różnicowania grzybów z gromady sprzężniaki (*Zygomycota*) w oparciu o makroskopowy wygląd kolonii na agarze MEA (podłoże agarowe z wyciągiem maltozowym) lub OA (agar owsiany) i cechy mikrohodowli (stadium anamorficzne) (oryg.)

Fig. 1. Examples of preliminary differentiation of fungi from *Zygomycota* according to macroscopic appearance of colony on MEA agar (agar with maltose extract) or OA (oat agar) and features of microculture (anamorphic stage)

do jałowego pojemnika i opracowana w czasie nie dłuższym niż 2 godziny; jeżeli nie jest to możliwe, należy przechowywać ją w lodówce. W przypadku trudności z odkrztuszeniem należy wykonać inhalację z Natrium bicarbonicum lub NaCl. Zaleca się, aby co najmniej 3 próbki (ok. 1 ml) zostały zbadane mikroskopowo i wykonano z nich posiewy. Przydatną procedurą jest BAL; pobrany materiał odwirowuje się i bada osad.

Przezskórna biopsja grubą igłą jest przydatna w przypadkach obwodowych zmian w płucach, kiedy nie są one dostępne podczas badania bronchoskopowego. Wycinki tkanek uzyskiwane podczas zabiegów operacyjnych, endoskopii lub biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej umieszcza się w sterylnym pojemniku, ewentualnie z niewielką ilością fizjologicznego roztworu NaCl.

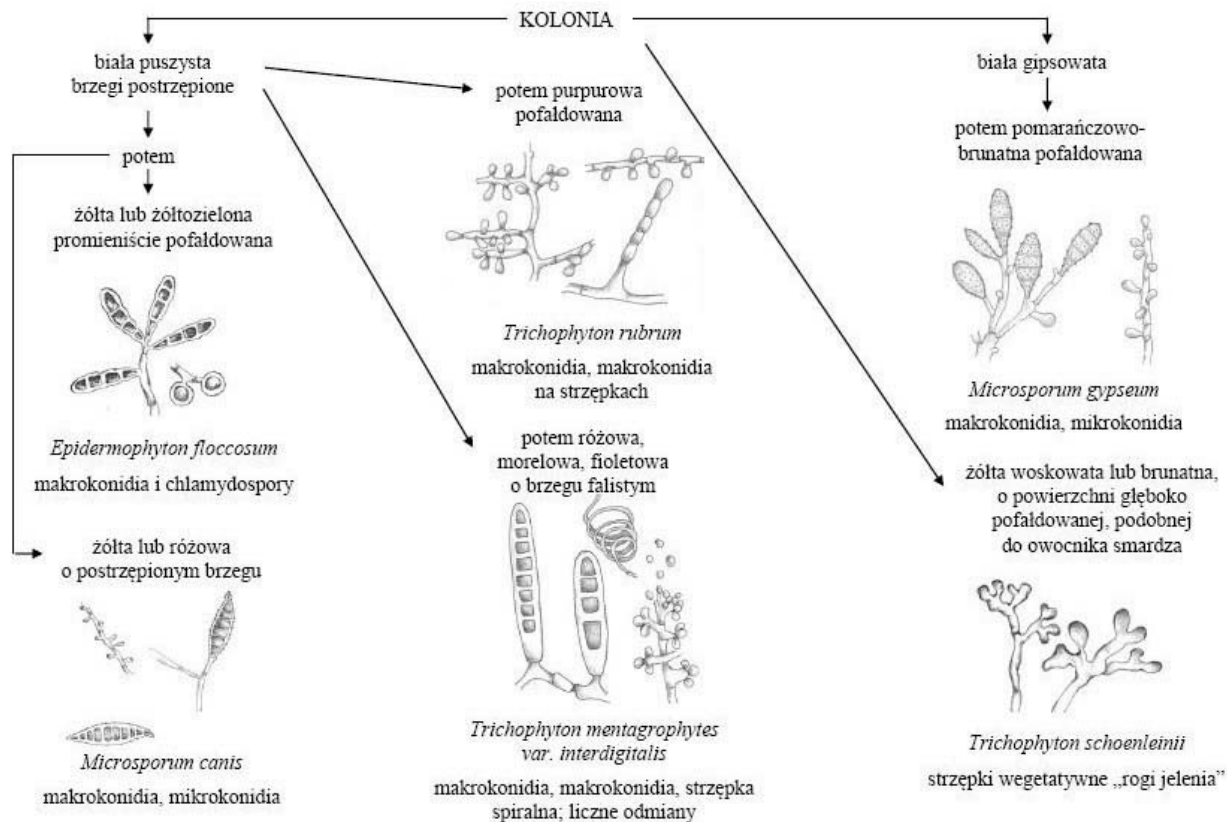
Wymazy z jamy ustnej, gardła, jamy nosa, krtani wykonuje się jałowymi wacikami, na suchych lub zwilżonym jałowym fizjologicznym roztworem NaCl szkiełkach podstawowych; materiał z migdałków podniebiennych najlepiej pobrać po wcześniejszym ich uciśnięciu. Można również, przy braku

makroskopowych zmian błony śluzowej jamy ustnej i gardła, wykonać popłuczyny za pomocą bulionu Sabourauda [5, 6].

Badania laboratoryjne obejmują techniki bezpośrednie, preparaty barwione, hodowle,

F3 – techniki bezpośrednie

Preparaty bezpośrednie są najprostszą metodą diagnostyczną, a niekiedy decydującą, jak np. zarażenia *Pneumocystis carinii* lub *Rhinosporidium seberi* [7]. Wykonuje się je ze wszystkich materiałów biologicznych w 0,85% roztworze NaCl, także z dodatkiem 0,1% safraniny. Widoczne są komórki pączkujące (blastokonidia), strzępki i pseudostrzępki u większości grzybów z rodzaju *Candida*, ale także *Trichosporum* i *Geotrichum*; komórki pączkujące, lecz bez pseudostrzępek u *Candida glabrata*, zaś szerokie otoczki u *Cryptococcus*. Liczne komórki pączkujące związane z komórką macierzystą wąskimi połączeniami sugerują *Paracoccidioides brasiliensis*. Sporangia (sferule) są charakterystyczne dla *Coccidioides immitis*. *Aspergillus* wykazuje strzępkę z konidioforami na szczycie buławkowato rozszerzonymi, *Penicillium* zaś ma konidiofory na



Rys. 2. Przykłady wstępnego różnicowania grzybów z gromady workowców (*Ascomycota*) w oparciu o makroskopowy wygląd kolonii na agarze Sabourauda z glukozą (SGA) i cechy mikrohodowli (stadium anamorficzne) (oryg.)
 Fig. 2. Examples of preliminary differentiation of fungi from *Ascomycota* according to macroscopic appearance of colony on Sabouraud agar with glucose (SGA) and features of microculture (anamorphic stage)

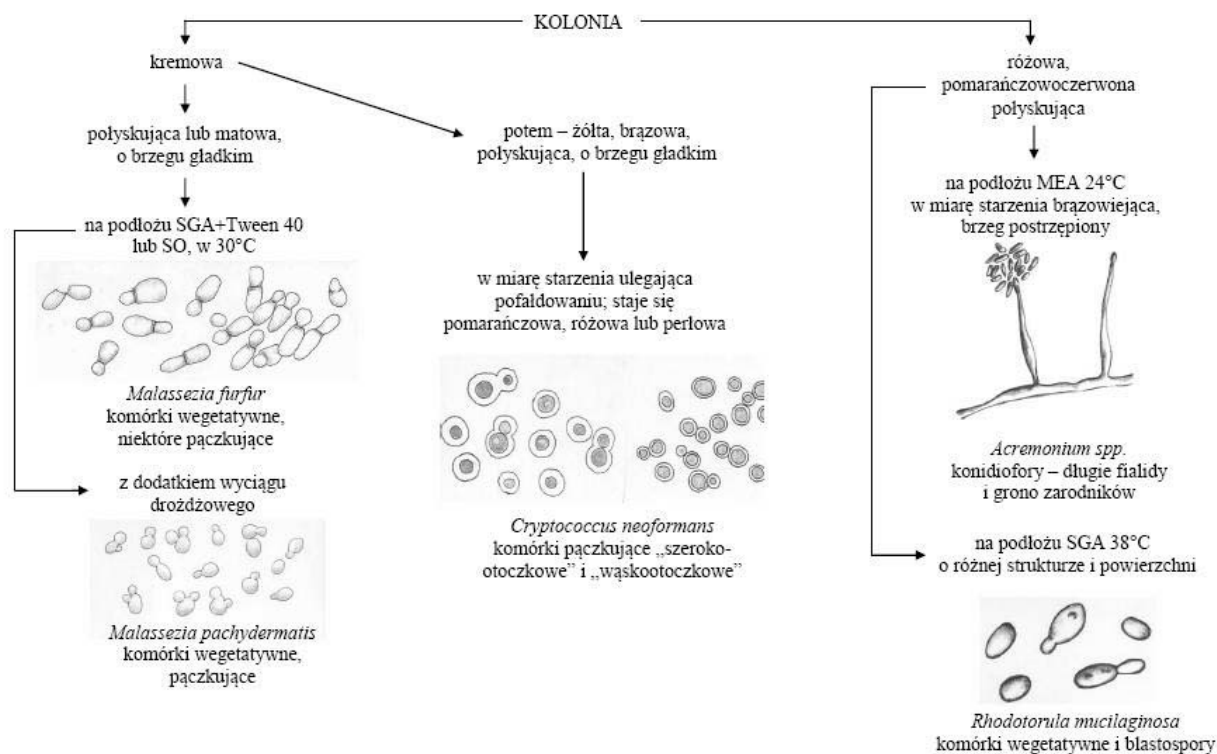
szczytce proste lub podzielone 2–3 razy lub wielokrotnie. Sporangiofory, tworzące na szczytach sporangia, wypełnione sporangiosporami sugerują *Zygomycetes*, takie jak *Rhizopus* lub *Mucor* [7].

Podjezwając zarażenie dermatofitami preparaty bezpośrednie sporządza się ze zmian skóry, zeszkobin naskórka, włosów lub ścinków paznokci; zeszkobiny pobiera się jałowym skalpelem i materiał umieszcza się na szkiełku podstawowym w 1–20% roztworze wodorotlenku sodu lub potasu, z dodatkiem 5% glicerolu lub 40–60% roztworze dwumetylosulfotlenku (DMSO); często odrębne preparaty bezpośrednie ocenia się w kropli ksylenu. Dla uzyskania odpowiedniego prześwietlenia ogląda się je najwcześniej po 30 minutach, w ciągu 3–5 minut, a następnie barwi [8].

F4 – preparaty barwione: rozmary, preparaty histopatologiczne

Rozmary wykonywane z wielu materiałów suszy się i utrzuwa w 70% alkoholu metylowym lub płynie Schaudinna, a następnie barwi. Strzępki barwią się hematoksyliną i eozyną, komórki drożdży i pseudostrzępki są Gram (+). W preparatach bar-

wionych barwnikiem Giemsy lub Wrighta grzyby są niebieskie, w metodzie Gridley'a barwią się na kolor purpurowo-czerwony, a tło preparatu na żółto. Metoda Gomoriego w modyfikacji Grocotta (srebrzenie) pozwala na wykrywanie strzępek, zaś odczyn PAS (z kwasem nadjodowym i odczynnikiem Schiffa) ułatwia identyfikację szczegółów komórki oraz ustalenie relacji między grzybami a pozostałymi elementami tkanki (grzyby barwią się na czerwono, a tło preparatu na jasnozielono); obydwie te metody uzupełniają się. Preparaty w kropli tuszu chińskiego lub indyjskiego, a także barwienie mucuskarminem są wykorzystywane do uwidocznienia polisacharydowej otoczki *Cryptococcus*, zaś barwnik Giemsy w wykrywaniu *Histoplasma capsulatum*, a fiolet krezolowy dla uwidocznienia sprężniaków (*Zygomycota*). Niektóre grzyby np. pleśniakowate i kropidlakowate, barwią się dobrze fuksyną kwaśną, natomiast do barwienia drożdży stosuje się błękit laktofenolowy, używany do farbowania bawełny (cotton-blue); większość gatunków w mikrohodowlach można też barwić metodą PAS używaną do barwienia grzybów w tkankach [6–8].



Rys. 3. Przykłady wstępnego różnicowania grzybów z gromady workowców (*Ascomycota*) w oparciu o makroskopowy wygląd kolonii na agarze (SGA, SMA, Czapka, BHJ z krwią) i cechy mikrohodowli (stadium anamorficzne) (oryg.)

Fig. 3. Examples of preliminary differentiation of fungi from *Ascomycota* according to macroscopic appearance of colony on agar (SGA, SMA, Czapek, BHJ with blood) and features of microculture (anamorphic stage) (orig.)

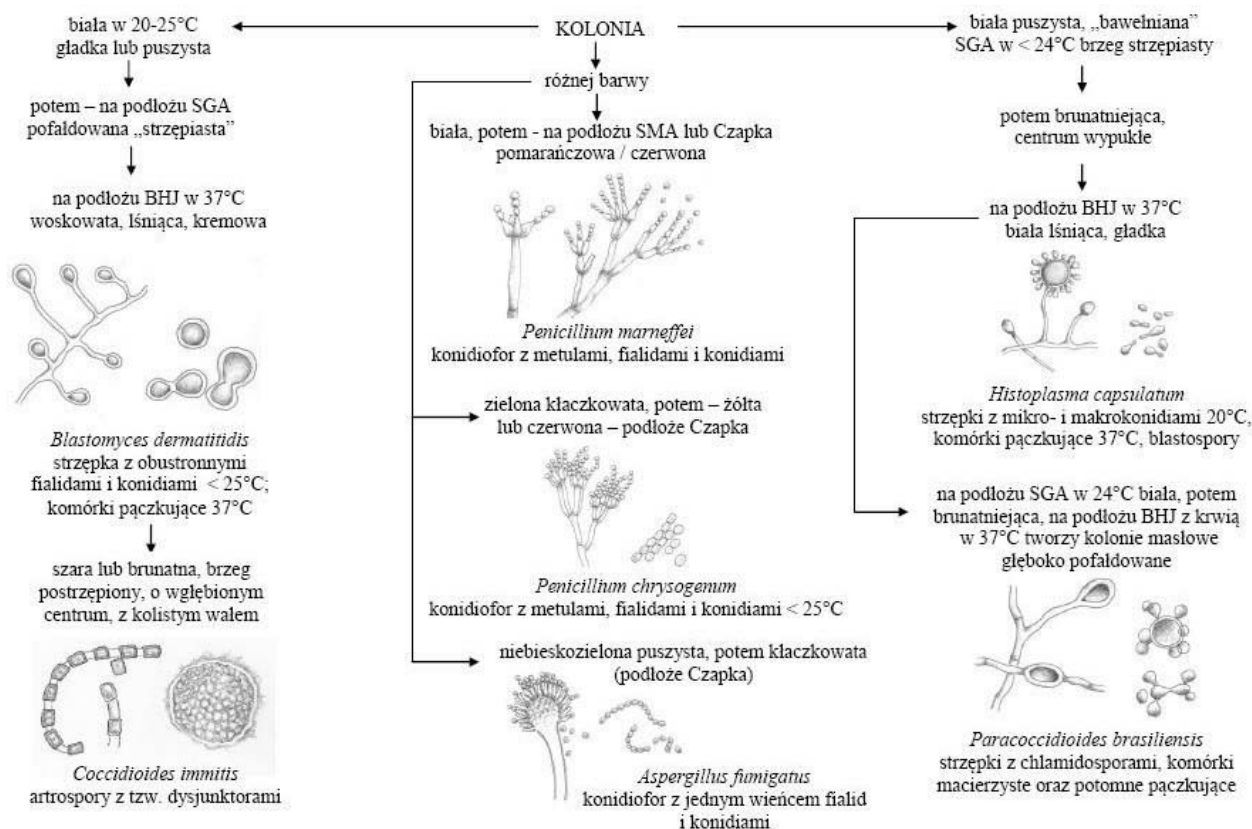
F5 – hodowle

Materiał pobrany do badania na obecność grzybów posiewa się na płynne lub stałe podłoża – zawierające białko, węglowodany i inne składniki – bezpośrednio w ilości 0,5–1,5 cm³. Tkanki lub wycinki pobrane z narządów homogenizuje się lub rozdrabnia przez wstrząsanie z jałowymi kulkami; materiały pobrane w czasie biopsji posiewa się jednocześnie na podłoża stałe lub płynne Sabourauda, agar z brzeczką oraz podłoże Czapka.

Posiewy inkubuje się w ciągu 24 godzin, w temperaturze 37°C, a następnie pozostawia się w 20°C lub 25°C. Po 3 dniach na wszystkich wyrosłych na podłożu stałym koloniach sporządza się preparaty bezpośrednie w 0,9% NaCl; z hodowli płynnych do kontroli pobiera się osad. Dalsze preparaty kontrolne wykonuje się po 5–10 dniach w ten sam sposób; posiewy pozostawia się pod obserwacją do 8 tygodni. Stwierdzenie w preparatach bezpośrednich elementów grzybów i przesianie kolonii na świeże podłoże pozwala na wyizolowanie po kilku

pasażach – nawet bez dodawania antybiotyków – czystych bezbakteryjnych szczepów. Badanie mikroskopowe wszystkich wyrosłych na agarze Sabourauda kolonii jest niezbędne ze względu na częsty wzrost na tym podłożu licznych rodzajów bakterii, których kolonie makroskopowe przypominają grzyby. Ułatwia izolowanie szczepów z zeszkobin skóry, włosów lub ścinków paznokci dodanie do hodowli – dla wyodrębnienia dermatofitów – cykloheksamidu (Acidion) [8–12].

Akseniczne szczepy grzybów wysiewa się na płytki Petriego z agarem Sabourauda i pozostawia w określonych temperaturach, a następnie ocenia makroskopowo charakter wyrosłych kolonii (zabarwienie, kształt, strukturę powierzchni, brzeg, stosunek do powierzchni agaru, połysk itp.). W razie wykrycia w materiale pochodzących od człowieka grzybów z rodzaju *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* lub innych tworzących puszyste, kożuchowate kolonie, które mogą stanowić zanieczyszczenie laboratoryjne, konieczne bywa powtórzenie



Rys. 4. Przykłady wstępnego różnicowania grzybów z gromady workowców (*Ascomycota*) w oparciu o makroskopowy wygląd kolonii na agarze Sabourauda (SGA, SMA) i cechy mikrohodowli (stadium anamorficzne) (oryg.)
 Fig. 4. Examples of preliminary differentiation of fungi from *Ascomycota* according to macroscopic appearance of colony on Sabouraud agar (SGA, SMA) and features of microculture (anamorphic stage)

nie posiewu od tego samego pacjenta. Wskazane jest również kilkakrotne przeniesienie hodowli grzyba na agar Czapka, ze względu na możliwość szybszego uzyskania charakterystycznych makroskopowo kolonii. Następnie sporządza się z nich preparaty bezpośrednie mierzy składniki grzybni, szerokość strzępek lub pseudostrzępek, wielkość komórek wegetatywnych i zarodników [8, 9]. Przykłady wstępnego różnicowania grzybów z różnych gromad w oparciu o makroskopowy wygląd kolonii i cechy mikrohodowli (stadium anamorficzne) przedstawiono na rysunkach 1–5 (oryg.).

Do dalszych badań mikroskopowych, z każdego wyodrębnionego szczepu grzyba zakłada się mikrohodowle na szkiełkach podstawowych lub nakrywkowych powleczonych cienką warstwą odpowiedniej pożywki agarowej. Mikrohodowle umieszcza się w wilgotnych komorach na 2–20 dni i kontroluje pod mikroskopem, w odstępach 48 h. W ocenie uwzględnia się charakterystyczne cechy grzybni, np. rodzaje, wielkość i sposób układania się zarodników. Po utrwaleniu mikrohodowli w 75% alko-

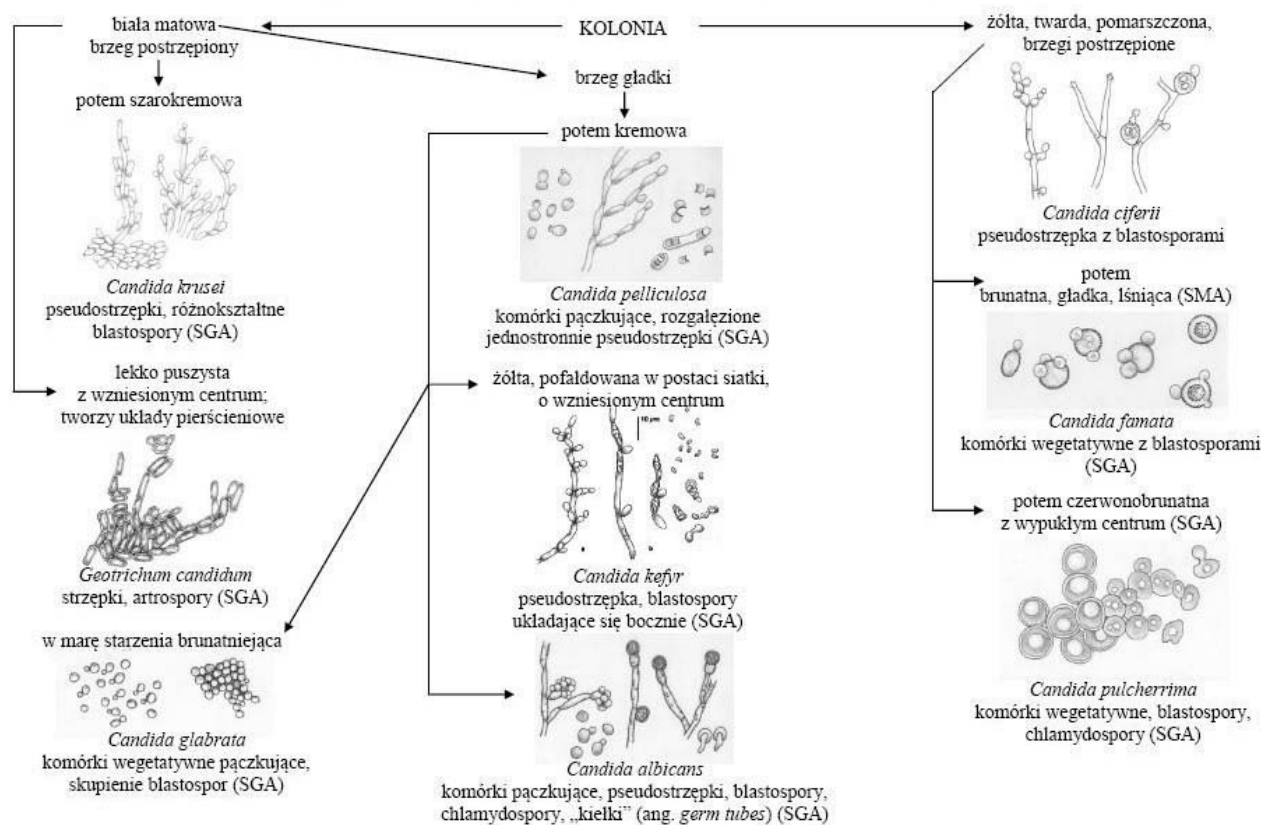
holu możliwe jest wykonanie preparatu trwałego [8–12].

Dla drożdży używa się także w różnicowaniu gatunków podłoża maltozowo-drożdżowego, test wytwarzania „germ-tubes” oraz reakcji barwnych z błękitem diazowym B (DBB) i chlorkiem 2, 3, 5-tryfenylotetrazolu (TTC) [8–12].

Ostatnio wprowadzono komercyjne podłoża, takie jak, np. Chromagar Candida (Becton Dickinson) i Candida ID Agar (bioMérieux), które pozwalają na wstępne określenie gatunku, kierując się barwą kolonii; test GLABRATA RTT (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France) umożliwia szybkie, w ciągu 20 min., rozpoznanie *Candida glabrata*.

Candida albicans wśród innych gatunków rodzaju *Candida*, oznacza się w oparciu o zdolność wytwarzania chlamydozpor, w mikrohodowlach na podłożu ziemniaczano-marchwiowo-żółciowym – PCB, zmodyfikowanej pożywce Nickersona wg Rzucidły lub podłożu z mąką kukurydzianą, owsianą lub ryżową.

Dla różnicowania *Candida albicans* i *Candida*



Rys. 5. Przykłady wstępnego różnicowania grzybów z gromady podstawczaki (*Basidiomycota*) w oparciu o makroskopowy wygląd kolonii na agarze MEA (podłoże agarowe z wyciągiem maltozowym) lub OA (agar owsiany) i cechy mikrohodowli (stadium anamorficzne) (oryg.)

Fig. 5. Examples of preliminary differentiation of fungi from *Basidiomycota* according to macroscopic appearance of colony on MEA agar (agar with maltose extract) or OA (oat agar) and features of microculture (anamorphic stage) (orig.)

dublinensis konieczne jest używanie podłoża GA-CA (agarowe, z nasionami *Guizotia abyssinica*). Oznaczenie zdolności tworzenia chlamydospor przez badany szczep (cecha np. *Candida albicans*) można przeprowadzić na podłożu RAT-Medium (bioMérieux), na którym tworzą się też blastospori i pseudostrzępki [8].

Niektóre gatunki, np. *Histoplasma capsulatum* wytwarzają charakterystyczne kolonie na podłożu z krwią. Dalszymi, pomocnymi w różnicowaniu drożdży i grzybów dymorficznych, są podłoża MEA (podłoże agarowe z wyciągiem słodowym), MEYA (podłoże agarowe z wyciągiem słodowym i drożdżowym) i YNB (Yeast Nitrogen Base).

Wybrane rodzaje grzybów wytwarzają barwniki przenikające do podłoża, np. *Penicillium marnefei* – czerwony. Natomiast *Malassezia* wymaga do wzrostu długo-łańcuchowych kwasów tłuszczowych; w przypadkach podejrzenia tego czynnika etiologicznego dodaje się do podłoża kilka kropel sterylnej oliwy lub wykorzystuje się podłoże agarowe LNA – Leminga i Notmana. Do izolowania z gleby, tzw. grzybów „pleśniowych” stosuje się metodę rozcieńczeniowo-płytkową Krzemieniewskich, płytek glebowych Warcupa, wilgotnych kamer i kultur mieszaných.

W dalszej diagnostyce określa się właściwości biochemiczne szczepów, m.in. używając testów API 20C oraz API 20C AUX (bioMérieux). API 20C, to biochemiczny szereg identyfikacyjny, pozwalający, w ciągu 24–48 h, zróżnicować najczęściej wykrywane u ludzi gatunki – spośród workowców (*Ascomycota*) z rodzajów *Saccharomyces*, *Candida*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia* i *Sporobolomyces*, natomiast – spośród podstawczaków (*Basidiomycota*) – *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*; wykorzystuje się w nim właściwości grzybów – fermentacyjne (zymogram) oraz przyswajania węgla z odpowiednich związków (auksanogram). API 20C AUX, to biochemiczny szereg identyfikacyjny opierający się na ocenie zdolności grzybów do przyswajania węgla (auksanogram) z 19 związków, a mianowicie: GLU (glukoza), GLY (glicerol), 2KG (2-keto-D-glukonian), ARA (L-arabinoza), XYL (d-ksyloza), ADO (adonitol), XLT (ksylitol), GAL (galaktoza), INO (inozytol), SOR (sorbitol), MDG (L-metylo-D-glukozyd), NAG (N-acetylo-D-glukozamina), CEL (celobioza), LAC (laktoza), MAL (maltoza), SAC (sacharoz), TRE (trehaloza), MLZ (melezytoza), RAF (rafinoza) [13].

Ostateczne oznaczenie gatunku grzyba ułatwia

opracowana zasada numerycznej identyfikacji podana w katalogu (Analytical Profile Index, bioMérieux, Lyon, 1990). Polega ona na punktacji wyników uzyskanych w 7 grupach ocenianych 19 właściwości biochemicznych oraz 1 cechy morfologicznej (tworzenie strzępek lub pseudostrzępek); [przykład ustalania kodu na schemacie. Warto zwrócić uwagę, że dane przenoszone na kartę wyników zostały połączone w grupy po trzy. Dla oznaczenia wyniku dodatniego posługujemy się wartościami 1, 2 lub 4, a przez dodanie trzech liczb odpowiadających wynikom w każdej grupie] otrzymujemy siedmiocyfrowy kod, o dużym – naszym zdaniem znaczeniu dla różnicowania wewnątrzgatunkowego oznaczanych szczepów grzybów [13].

Aktywność enzymatyczną szczepów ocenia się za pomocą testu API ZYM (bioMérieux), zawierającego substraty dla ujawnienia 19 hydrolaz: e₂fosfataza alkaliczna, e₃esteraza (C4), e₄lipaza estera-zowa (C8), e₅lipaza (C14), e₆arylamidaza leucyny, e₇arylamidaza waliny, e₈arylamidaza cystyny, e₉trypsyna, e₁₀α-chymotrypsyna, e₁₁fosfataza kwaśna, e₁₂fosfohydrolaza naftylo-AS-BI, e₁₃α-galaktozydaza, e₁₄-galaktozydaza, e₁₅β-glukuronidaza, e₁₆α-glukozydaza, e₁₇β-glukozydaza, e₁₈N-acetylo-β-glukozaminidaza, e₁₉α-mannozydaza, e₂₀α-fukozydaza; biotypowanie szczepów przeprowadza się w oparciu o zaproponowany przez Kurnatowską system [13]. Właściwości proteolityczne określa się metodą Staiba wobec albuminy ludzkiej w pH 4,6, w modyfikacji Róźgi, pozwalającej na ilościową ocenę wyników – strefę proteolizy mierzy się w mm [14].

Następnie różnicując szczepy drożdży ocenia się zdolność przyswajania azotu z pożywek zawierających azotan potasu, siarczan amonowy, asparaginę, mocznik i pepton.

Przy oznaczaniu drożdży bada się także zdolność rozszczepiania arbutyny; arbutyna pod wpływem produktów przemiany materii niektórych gatunków grzybów ulega rozszczepieniu na część glikonową i aglikon (hydrochinon), który z żelazem daje reakcję barwną – podłoże zabarwia się na brunatno.

W różnicowaniu *Cryptococcus* sp. bada się także zdolność wytwarzania skrobi, wysiewając szczep grzyba na podłoże specjalne.

Warto dodać, że niektóre grzyby (np. z rodzaju *Microsporum*) pasożytujące na skórze lub włosach wykrywa się dzięki charakterystycznej fluorescencji w lampie Wooda, którą wykorzystuje się w ocenie zmian u pacjenta oraz włosach zarażonych *in vitro*.

Do szybszej izolacji i identyfikacji grzybów wy-

odrębnianych ze skóry stosuje się Mycoline (bioMérieux). Mycoline składa się z pokrytej z każdej strony innym podłożem agarowym plastikowej płytki, hermetycznie zamkniętej w plastikowym pojemniku. Strona 1. – barwy blado-różowej, zawiera agar Sabourauda, z gentamycyną i chloramfenikolem; służy do izolowania drożdży i grzybów pleśniowych; antybiotyki zawarte w podłożu eliminują większość bakterii. Strona 2. – barwy żółto-pomarańczowej, zawiera agar Sabourauda, z cykloheksamidem (Actidion) i chloramfenikolem; jest to podłoże selektywne dla izolowania dermatofitów, zwłaszcza szczepów opornych na cykloheksamid. Dermatofity powodują zmianę pH pożywki (staje się zasadowe) ujawniając barwę czerwoną w podłożu, już po 48 h od posiania materiału; pełny ich wzrost na tym podłożu następuje po 5–8 dniach [13].

Wśród dalszych metod rozpoznawczych stosowanych w mikologii można wymienić wstrzykiwanie zwierzętom doświadczalnym materiału pobranego bezpośrednio od chorego. Oznaczenie gatunku grzyba (np. *S. schenckii*, *H. capsulatum*, *C. neoformans*) wywołującego zmiany grzybicze wymaga często bowiem oceny mikroskopowej tych zmian w ustroju ssaka. Najczęściej spośród zwierząt doświadczalnych używa się w tym celu świnek morskich, szczurów, myszy i królików, którym wstrzykuje się badany materiał podskórnym, dootrzewnowo lub dojądrowo. Po śmierci zwierząt do badania histopatologicznego pobiera się wszystkie narządy mięszkowe.

F6 – inne techniki

Techniki fluorescencyjne

Barwniki fluorescencyjne (Calcofluor, Uvitex 2B, Blankophor) barwią selektywnie chitynę ściany komórkowej grzybów i mogą być wykorzystane zarówno dla skrawków mrożonych, jak i parafinowych, a także dla próbek świeżych, np. popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, zeskrubin z rogówki [7].

Immunohistochemia, immunofluorescencja, hybrydizacja *in situ*

Badania immunohistochemiczne z przeciwciałami monoklinalnymi (WF-AF-1, EB-A1), immunofluorescencja i hybrydizacja *in situ* są również wykorzystywane w diagnostyce celem ustalenia rodzaju i gatunku, zwłaszcza w przypadkach kiedy nie udaje się wyhodować grzybów, np. zastosowanie immunofluorescencji dla wykrycia antygenów *Pneumocystis carinii* daje czułość do 100% i specyficzność 96% [7].

W ostatnich latach w diagnostyce grzybic znalazły zastosowanie metody serologiczne i biologii molekularnej, które są przedmiotem oddzielnego opracowania [15].

Należy podkreślić, że diagnostyka grzybów powinna być prowadzona do poziomu gatunku, ze względu na konieczność wyboru leków oraz możliwości prognozowania kierunku rozwoju inwazji grzyba.

Literatura

- [1] Willinger B. 2006: Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections. *Current Drug Targets* 7: 513–522.
- [2] Badley J.W., Stroud T.P., Salzman D., Pappas P.G. 2001. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1319–1324.
- [3] Clark T.A., Hajjeh R.A. 2002. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15: 569–574.
- [4] Shao P.L., Huang L.M., Hsueh P.R. 2006. Invasive fungal infection – laboratory diagnosis and antifungal treatment. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 39: 178–188.
- [5] Myint S. 2002. Recent advances in the rapid diagnosis of respiratory tract infection. *British Medical Bulletin* 61: 97–114.
- [6] O’Shaughnessy E.M., Shea Y.M., Witebsky F.G. 2003. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infectious Disease Clinics of North America* 17: 135–158.
- [7] Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Diseases* 5: 609–622.
- [8] Kurnatowska A. 2006. Badania diagnostyczne. W: *Mikologia medyczna*. (Red. A. Kurnatowska, P. Kurnatowski). Promedi, Łódź: 53–78.
- [9] De Hong G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Universitat Rovira I Virgili, Rens.
- [10] Kurnatowska A. 2006. Różnicowanie wybranych cech wewnątrzgatunkowych grzybów oraz przykłady biotypowania szczepów. W: *Mikologia medyczna*. (Red. A. Kurnatowska, P. Kurnatowski). Promedi, Łódź: 93–202.
- [11] McClenny N. 2005. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Medical Mycology* 43, suppl.1: S125–128.
- [12] Ochman E. 2006. Diagnostyka mikrobiologiczna i serologiczna układowych zakażeń grzybiczych. W: *Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia*. (Red. D. Dzierżanowska). Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała: 50–78.

- [13] Freydiere A.M., Guinet R., Boiron P. 2001. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology* 39: 9–33.
- [14] Różga A. 1983. Właściwości lipolityczne i proteolityczne szczepów *Candida* wyodrębnionych z ontocenozy ustroju człowieka. Rozprawa doktorska, AM, Łódź.
- [15] Kuba K. 2008. Metody molekularne stosowane w diagnostyce grzybic. *Wiadomości Parazytologiczne* 54: 187–197.

Wpłynęło 14 maja 2008

Zaakceptowano 20 czerwca 2008